

PCT/JP00/01069

24.02.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 14 APR 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 2月24日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第093263号

出願人
Applicant(s):

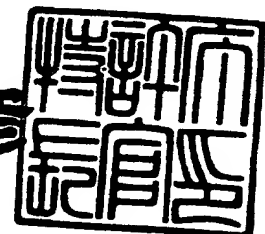
財団法人癌研究会

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月31日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3021313

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-0241J2

【提出日】 平成11年 2月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都板橋区加賀 2-3-1-301

 【氏名】 濱田 洋文

【特許出願人】

 【識別番号】 000173588

 【氏名又は名称】 財団法人癌研究会

 【代表者】 渡邊 宏

【代理人】

 【識別番号】 100106574

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岩橋 和幸

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 委任状 1

 【物件名】 原寄託についての受託証 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ウイルスベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ウイルスを構成するタンパク質に、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH) 受容体に特異的に結合するリガンドを結合させてなるウイルスベクター。

【請求項 2】 ウイルスを構成するタンパク質が、リンカーを介してメラニン細胞刺激ホルモン (MSH) 受容体に特異的に結合するリガンドに結合している請求項 1 記載のウイルスベクター。

【請求項 3】 リンカーがオリゴペプチドである請求項 2 記載のベクター。

【請求項 4】 リンカーが配列番号 25、27、29 および 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項 3 記載のベクター。

【請求項 5】 ウイルスを構成するタンパク質が、ウイルスの外表面を構成するタンパク質である請求項 1～4 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 6】 リガンドが、 α -MSH、 β -MSH、 γ -MSH およびこれらのいずれかの誘導体からなる群より選ばれるリガンドである請求項 1～5 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 7】 ウイルスが、アデノウイルス科、レトロウイルス科、パルボウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、パポーバウイルス科、ヘパドナウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、ラズドウイルス科、パラミクソウイルス科、オルソミクソウイルス科、バンヤウイルス科、アレナウイルス科およびレオウイルス科よりなる群のいずれかの科に属するウイルスから選ばれる請求項 1～6 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 8】 ウイルスがヒトアデノウイルスである請求項 1～6 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 9】 ウイルスが外来の遺伝子を含むウイルスである請求項 1～8 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 10】 遺伝子が、非毒性のプロドラッグを細胞毒性を有する薬剤に変換することができる酵素をコードする遺伝子である請求項 9 記載のベクター。

【請求項 11】 遺伝子が、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (H S V - t k) またはシトシン・デアミナーゼ (C y t o s i n e d e a m i n a s e, C D) をコードするものである請求項 10 記載のベクター。

【請求項 12】 遺伝子が、直接または間接的に細胞毒性作用を有する分子をコードするものである請求項 9 記載のベクター。

【請求項 13】 遺伝子がサイトカイン、細胞増殖因子または細胞増殖抑制因子をコードするものである請求項 12 記載のベクター。

【請求項 14】 遺伝子が腫瘍抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子または細胞死調節遺伝子である請求項 12 記載のベクター。

【請求項 15】 外来の遺伝子が、アデノウイルス E 1 A ないし E 1 B の野生型または変異型の遺伝子の全部または一部である請求項 9 記載のベクター。

【請求項 16】 請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のベクターを含有してなる医薬。

【請求項 17】 請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のベクターを含有してなる抗腫瘍剤。

【請求項 18】 腫瘍が悪性黒色腫である請求項 17 記載の抗腫瘍剤。

【請求項 19】 請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のベクターを含有してなる腫瘍の診断薬。

【請求項 20】 腫瘍が悪性黒色腫である請求項 19 記載の診断薬。

【請求項 21】 配列番号 25、27、29 および 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するリンカー。

【請求項 22】 請求項 21 記載のリンカーをコードする DNA。

【請求項 23】 配列番号 24、26、28 および 30 のいずれかに示される塩基配列からなる DNA。

【請求項 24】 配列番号 32 ~ 39 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項 25】 請求項 24 記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 26】 配列番号 7、13、17、18、20、21、22 および 23 のいずれかに示される塩基配列からなる DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ウイルスを構成するタンパク質に、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）受容体に特異的に結合するリガンドを結合させてなるウイルスベクターおよび、該ベクターを用いた腫瘍に対する診断薬および治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

転移を伴う悪性黒色腫は、放射線療法や化学療法などの従来の治療法に抵抗性であり、予後はきわめて不良である。そのため、新しい有効な治療法の開発が強く望まれる。一方、ウイルスベクターなどを介した遺伝子導入を用いた癌治療法（癌に対する遺伝子治療法）は、近年多くの臨床研究が開始され、期待を集めている。

【0003】

しかしながら、現在、悪性黒色腫に対して十分に治療効果をあげるような効果的な遺伝子導入を行う方法は確立されていない。例えば、従来のレトロウイルス、アデノウイルス、アデノウイルス随伴ウイルス（AAV）などのウイルスベクターでは悪性黒色腫細胞に対する遺伝子導入効率は十分でない。

本発明者らは現行のアデノウイルスベクターの悪性黒色腫細胞株に対する遺伝子導入効率について検討し、比較的高いMOI（multiplicity of infection）のウイルスを用いても十分な遺伝子導入効率を得られないことを示している〔Yoshida et al., Hum Gene Ther., 9 (17) 2503-2515, 1998、（以下、Yoshida et al., 1998と略記する）〕。この論文に示された結果中、MOI 100では、A375ヒト悪性黒色腫細胞で50%、RPMI7951悪性黒色腫細胞で80%、WM115悪性黒色腫細胞で50%程度の遺伝子導入効率を得られるに過ぎず、100%に近い遺伝子導入を得るにはさらに大量のアデノウイルスの投与を必要とする。

【0004】

現行のウイルスベクターは、単に遺伝子導入の効率が低いのみでなく、周辺の正常細胞にも非選択的に遺伝子が導入されるという欠点を持つ。すなわち、悪性黒色腫の治療を行うベクターとしては、効率が低く、悪性黒色腫に対する選択性も乏しい。

アデノウイルスのファイバーのC末端ないしHIループ部分に変異アミノ酸配列を入れて、宿主域を改変する試みは、米国GenVec社のWickham、アラバマ大学のCurrielらのグループによって報告されている[Wickham et al., J. Virol. 71, 8221 (1997)、Wickham et al., Gene Ther. 2, 750 (1995)、Wickham et al., Nat. Biotechnology, 14, 1570 (1996)、Curriel et al., Hum. Gene Ther. 3, 147 (1992)、Dimitriev et al., J. Virol. 72, 9706 (1998)、WO94/10323、WO96/07734、]。

【0005】

多くのヒト悪性黒色腫に、MSH受容体が存在しMSHが結合することが報告されている[Siegrist et al., Cancer Res. 49, 6352 (1989)]。したがって、MSHをウイルスの外皮タンパク質に結合させたウイルスベクターは、悪性黒色腫に効率的に遺伝子を導入できるベクターとなることが予想される。しかし、MSHリガンドを含むベクターの作成に成功したとの報告や、MSH受容体を標的とした遺伝子治療の可能性を実証した報告は見当たらない。アデノウイルス以外のウイルスベクターとしては、レトロウイルスのエンベロープタンパク質に細胞の増殖因子(エリスロポエチン[Kasahara et al., Science 266:1373 (1994)])、あるいは単鎖の抗体[Jiang et al. J. Virol. 72 (12):10148 (1998)]などを融合するように組み込んで標的化を目指しているもの、あるいは単純ヘルペスウイルスのC糖タンパク質にエリスロポエチンを融合させたもの[Laquerre et al., J. Virol. 72 (12):9683 (1998)]などがある。Jiangらの報告では、単鎖

抗体の抗原としてEGF (epidermal growth factor) 受容体ファミリーに属するHer2neu、骨髄幹細胞に特異的といわれるCD34、トランスフェリン受容体が標的として検討されている。また、インデグリンと結合するRGDモチーフを人工的に組み込んだキメラウイルスタンパク質の報告は、アデノウイルスでは前述のWickhamのグループ [Wickham et al., J. Virol. 71:8221 (1997)] とCurieのグループ [Dimitriev et al., J. Virol. 72:9706 (1998)] から、さらにアデノウイルス以外では、B型肝炎ウイルスのコアタンパク質 [Chambers et al., J. Virol. 70:4805 (1996); Sharma et al., Virology 239:150 (1997)]、バクテリオファージFdタンパク質 [Koivunen et al., J. Biol. Chem. 268:20205 (1993); Koivunen et al., J. Cell Biol. 124:373 (1994)] などについてすでに報告されている。しかしながら、アデノウイルス以外でもMSHリガンドを含むウイルスベクターや、MSH受容体を標的とした遺伝子治療の可能性を実証した報告は見当たらない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

悪性黒色腫の遺伝子治療を開発してゆくためには、現行のウイルスベクターでは遺伝子導入の効率も選択性も乏しい。従って、悪性黒色腫に対して効率よく選択的に遺伝子導入が可能な手段に対する要望は依然として存在する。そのようなベクターの使用によって、従来の治療に対して抵抗性で予後のきわめて悪い悪性黒色腫に対してさまざまな遺伝子治療法によるアプローチが必要である。

【0007】

本発明の目的は、悪性黒色腫を含めた腫瘍の治療および診断に有用な、ウイルスを構成するタンパク質にMSH受容体に特異的に結合するリガンドを結合させてなるウイルスベクターおよび当該ウイルスベクターの利用方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、従来のウイルスベクターによる遺伝子導入法では悪性黒色腫に対し効率が低く選択性に乏しいとの上記問題点が、ウイルスを構成するタンパク質に、MSH受容体に特異的に結合するリガンドを結合させてなるウイルスベクターを用いることにより解決できることを見出し、本発明を完成させた。また、このようなウイルスベクターは、作用機作上、アデノウイルスのファイバーと同様に、ウイルスを構成するタンパク質にMSH受容体に特異的に結合するリガンドを結合させることができる他のウイルスを用いたベクター系にも適用できる。

【0009】

このようなウイルスベクターを悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対して遺伝子導入用のベクターとして用いれば、効率が高く選択性に優れた遺伝子導入が達成される。

従って、本発明によれば、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対して高効率かつ高選択性のウイルスベクター、さらにはそれをもとにして作成される組換えウイルスベクターが提供される。このような組換えウイルスベクターは、含有させる遺伝子を選ぶことによって、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍細胞を特異的に見分ける診断薬として、または当該腫瘍細胞を特異的に殺す癌治療薬として、あるいは当該腫瘍の持つ抗原性を特異的に高める癌の免疫治療剤として適用できる、診断用並びに治療用のベクターとして有用である。

【0010】

従来のアデノウイルスベクターは、ヒト5ないし2型アデノウイルスをベースとした組換え体が主体で、悪性黒色腫に対する遺伝子導入効率は、50%導入を得られるウイルス量(ED_{50})がMOI 100前後である(Yoshida et al., 1998)。すなわち、悪性黒色腫に対しては余り高い導入効率が得られない。一方、正常細胞に対してもそれと同等ないしそれ以上の高い効率で遺伝子導入が得られるため、悪性黒色腫に特異的な高い遺伝子導入効率は望めない。本発明のウイルスベクターを用いることにより、1)悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対して従来法に比べ飛躍的に高い導入効率を得ら

れ、2) 周辺の正常細胞に対しては、従来のベクターと同等ないしそれ以下の導入効率であるため、結果として、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対して特異性の高い遺伝子導入が可能である。そのため、1) 高い発現量が必要な場合は、従来法と同じウイルス量を用いたとしても、標的となる腫瘍細胞に対し従来法よりも高い遺伝子発現が得られ、結果としてより高い効果が得られる。また、2) 比較的低い発現量で十分な効果が得られるような遺伝子の場合には、本ベクターを用いればウイルスの投与量を減らすことが可能であり、結果としてウイルス投与に伴う望ましくない副作用（アレルギー反応や周辺正常細胞の傷害など）を軽減することが可能である。

【0011】

また、E1Aを持つアデノウイルスなどの増殖可能な組換えウイルスと一体型に組み合わせて用いれば、感染効率の増加と、感染したあとの腫瘍組織内でのウイルスの増殖再感染とが相乗的に働き、非常に有効な治療法となる。

従って、本発明は、悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍の治療に対して高い有用性を有している。

【0012】

ファイバータンパク質のC末端などにMSHとは別種のリガンドを入れた変異アデノウイルスの作成はすでに報告がある。しかし、リガンドを入れたためにアデノウイルスができなくなってしまうものが多い。たとえウイルスができたとしても、得られたものが期待通りの受容体に対するアフィニティーを有していないものである場合も多い[Wickham et al., J. Virol. 71. (11) 8221-8229 (1997) 参照]。従って、既に知られている

リガンドから派生する融合タンパク質を用いて、すでに知られている受容体を標的としたベクターであっても、有用なウイルスベクターが得られるか否かは実際にそれらを作成して、作用させてみるまでは全く不明である。例えば、Wickhamらは、E-セレクトインと結合するモチーフ配列(TRSDITWDQLW WDLMKTS)やラミニンリセプターと結合するモチーフ配列(TSAA(SIKVAV)₂)をアデノウイルスのファイバーのC末端に挿入したベクターを作製したが、組換えアデノウイルスはできなかった。また、同様に α vインテグ

リンと結合するRGDモチーフを含む配列TS (GRGDTF)₃SSやラミニンリセプターと結合するモチーフ配列TS (GYIGSR)₃SSを同様に挿入したベクターおよびその組換えアデノウイルスを作製したが、それぞれ予想されるリセプターに対する特異的結合が見られなかったと報告している[Wickham et al. J., Virol. 71 (11) 8221-8229 (1997)]。本発明のウイルスベクターでは悪性黒色腫に対して通常期待される以上の格段に優れた結果が得られた。

【0013】

本発明者は、MSH受容体が多く黒色腫細胞で発現している[Siegrist et al., Cancer Res. 49, 6352 (1989)]ことと、リガンドであるMSHがMSH受容体に高いアフィニティーで特異的に結合することを利用して、悪性黒色腫細胞に効率よく感染し遺伝子導入できるベクターを完成させた。本発明のベクターは悪性黒色腫だけでなく、MSH受容体を発現している他の腫瘍にも有効である。

【0014】

本発明は、以下の(1)～(26)に関する。

(1) ウイルスを構成するタンパク質に、MSH受容体に特異的に結合するリガンドを結合させてなるウイルスベクター。

(2) ウイルスを構成するタンパク質が、リンカーを介してメラニン細胞刺激ホルモン(MSH)受容体に特異的に結合するリガンドに結合している(1)のウイルスベクター。

(3) リンカーがオリゴペプチドである(2)のベクター。

(4) リンカーが配列番号25、27、29および31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する(3)のベクター。

(5) ウイルスを構成するタンパク質が、ウイルスの外表面を構成するタンパク質である(1)～(4)のいずれかのベクター。

(6) リガンドが、 α -MSH、 β -MSH、 γ -MSHおよびこれらのいずれかの誘導体からなる群より選ばれるリガンドである(1)～(5)のいずれかのベクター。

(7) ウイルスが、アデノウイルス科、レトロウイルス科、パルボウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、パポーパウイルス科、ヘパドナウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、オルソミクソウイルス科、バンヤウイルス科、アレナウイルス科およびレオウイルス科よりなる群のいずれかの科に属するウイルスから選ばれる(1)～(6)のいずれかのベクター。

(8) ウイルスがヒトアデノウイルスである(1)～(6)のいずれかのベクター。

(9) ウイルスが外来の遺伝子を含むウイルスである(1)～(8)のいずれかのベクター。

(10) 遺伝子が、非毒性のプロドラッグを細胞毒性を有する薬剤に変換することができる酵素をコードする遺伝子である(9)のベクター。

(11) 遺伝子が、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ(HSV-tk)またはシトシン・デアミナーゼ(Cytosine deaminase, CD)をコードするものである(10)のベクター。

(12) 遺伝子が、直接または間接的に細胞毒性作用を有する分子をコードするものである(9)のベクター。

(13) 遺伝子がサイトカイン、細胞増殖因子または細胞増殖抑制因子をコードするものである(12)のベクター。

(14) 遺伝子が腫瘍抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子または細胞死調節遺伝子である(12)のベクター。

(15) 外来の遺伝子が、アデノウイルスE1AないしE1Bの野生型または変異型の遺伝子の全部または一部である(9)のベクター。

(16) (1)～(15)のいずれかのベクターを含有してなる医薬。

(17) (1)～(15)のいずれかのベクターを含有してなる抗腫瘍剤。

(18) 腫瘍が悪性黒色腫である(17)の抗腫瘍剤。

(19) (1)～(15)のいずれかに記載のベクターを含有してなる腫瘍の診断薬。

(20) 腫瘍が悪性黒色腫である(19)の診断薬。

(21) 配列番号 25、27、29 および 31 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するリンカー。

(22) (21) のリンカーをコードする DNA。

(23) 配列番号 24、26、28 および 30 のいずれかに示される塩基配列からなる DNA。

(24) 配列番号 32～39 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(25) (24) 記載のベクターをコードする DNA。

(26) 配列番号 7、13、17、18、20、21、22 および 23 のいずれかに示される塩基配列からなる DNA。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明のベクターに用いられるウイルスは、アデノウイルス科、レトロウイルス科、パルボウイルス科、ヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科、パポーウイルス科、ヘパドナウイルス科、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科、ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、オルソミクソウイルス科、バンヤウイルス科、アレナウイルス科およびレオウイルス科よりなる群のいずれかの科に属するウイルスおよびこれらのウイルスより由来するベクターおよびアデノウイルスドデカヘドロンベクター (Fender et al., Nature Biotech. 15: 52-56 (1997)) のようなウイルスタンパク質から由来するベクター、ウイルスタンパク質をリポソームに組み合わせたベクター (例えば、センダイウイルスとリポソームベクター等) 等が包含されるが、ヒトアデノウイルスが好ましく用いられる。

【0016】

ベクターの作製は、ウイルスを構成するタンパク質をコードする DNA に対し、一般的な組み換え DNA 作成技術 (Sambrook et al. 編、Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. など参照) を用いて該タンパ

ク質とMSHリガンドとの融合タンパク質をコードするように該当するウイルスタンパク質のコード領域を入れかえることによって行なえる。組換えウイルスの作成、あるいはリポソームとの複合体などの作成については既存の方法に従う。例えば以下のような文献に記載の方法により行うことができる。

【0017】

Wolff ed., Gene therapeutics: Methods and applications of direct genetran sfer. Birkhaeuser, Boston, 1994; Kapli tt and Loewy eds., Viral vectors: Gene therapy and neuroscience appllicatio ns. Academic Press, San Diego, 1995; Li u et al. eds., DNA vaccines: A new era in vaccinology. Annals of the New Yo rk Academy of Sciences vol. 772. The New York Academy of Sciences, New Yor k, 1995; Gluzman and Hughes eds., Vir al vectors: Current communications in molecular biology Cold Spring Harbo r Laboratory, New York, 1988; Roth ed., Methods in cell biology: vol. 43. Pro tein expression in animal cells. Aca demic Press, San Diego 1994.

【0018】

本発明に用いられるウイルスを構成するタンパク質としては、例えば、ウイル スの外表面を構成するタンパク質として、VSV (vesicular sto matitis virus) のGタンパク質、レトロウイルスのエンベロープ タンパク質 (env)、アデノウイルスのキャプシドタンパク質 (ヘキソン、ペ ントンベース、ファイバー)、インフルエンザウイルスのHemaggluti nin、パラミクソウイルスの表面糖タンパク質などが挙げられるが、癌細胞な

どの宿主細胞の表面への吸着や特異的受容体との相互作用を担うようなウイルスタンパク質であれば、いずれも本発明に用いられる。

【0019】

本発明に用いられるMSH受容体に特異的に結合するリガンドとしては、 α -MSH、 β -MSH、 γ -MSH等が挙げられる。またこれらの変異体（誘導体やランダムペプチドからスクリーニングしたものなど）を作成して、天然のMSHよりも一層MSH受容体との結合力の強いものを人工的に作成することも可能である。本発明に用いられるリガンドは、これら全てのMSHないしMSH様のリガンドを包含する。

【0020】

以下の説明においては、MSH受容体に特異的に結合するリガンドをMSHと略記するが、本発明においては、MSH受容体と強い親和力を有する全てのリガンドも同様に用いることができる。

MSHとウイルスタンパク質との結合は、直接結合させることもできるが、リンカーペプチドを介して結合させることもできる。リンカーペプチドについては、長さは1から100残基程度までのオリゴペプチドが用いられる。当該オリゴペプチドの配列としては、文献上報告された特定のペプチド配列でも、未報告のペプチド配列でも、MSH機能を保持しながらウイルスタンパク質とMSHとを結びつけるような役割を果たすペプチドであれば、MSHのC末端、内部あるいはN末端のどちらについているか、長さ、配列などは問わず、いずれでも本発明に用いることができる。

【0021】

MSHがウイルスを構成するタンパク質に結合する位置は、当該タンパク質のC末端、内部またはN末端であっても、いずれの位置であってもよい。例えば、アデノウイルスのファイバータンパク質のようなウイルスを構成するタンパク質のC末端に配列番号25、27、29および31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するオリゴペプチドを介してMSHのN末端を結合させることができる。当該配列番号25、27、29および31のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するリンカーペプチドおよび当該ペプチドをコードするDNAも本発明に包

含まれる。

【0022】

本発明のペプチドリッカーを介してMSHを結合させたウイルスベクターを構成するタンパク質の具体例としては、配列番号32～39のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するタンパク質等が挙げられる。当該タンパク質をコードするDNAも本発明に包含される。具体的には、配列番号7、13および17～23のいずれかに示される塩基配列からなるDNA等が挙げられる。

【0023】

本発明のウイルスベクターに外来の遺伝子を組み込むことにより、当該遺伝子を効率的に標的細胞に導入することができる。当該外来遺伝子を含むウイルスベクターも本発明に包含される。例えば、外来遺伝子として、直接的または間接的に標的細胞に対して細胞毒性作用を有するような分子をコードする遺伝子を組み込むことにより、癌細胞等の標的細胞を効率的かつ選択的に殺すことができる。このような遺伝子としては、例えば、サイトカイン、細胞増殖因子および細胞増殖抑制因子等をコードする遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子、細胞死調節遺伝子等が挙げられる。

【0024】

また、外来遺伝子として、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ（HSV-tk）、シトシン・デアミナーゼ（Cytosine deaminase, CD）等の非毒性のプロドラッグを細胞毒性を有する薬剤に変換することができる酵素をコードする遺伝子を組み込むことにより、標的細胞を当該プロドラッグに対して感受性（sensitive）にすることができる。例えば、HSV-tkをコードする遺伝子を組み込んだ場合は、標的細胞をガンシクロビルまたはアシクロビルに対して感受性にすることができ、CDをコードする遺伝子を組み込んだ場合は、標的細胞内で非毒性の5-フルオロシトシンを細胞毒性を有する薬剤である5-フルオロウラシルに変換させることができる。

【0025】

また、外来の遺伝子は、アデノウイルスE1AないしE1Bの野生型または変異型の遺伝子の全部または一部であってもよい。

本発明のウイルスベクターは、医薬、例えば、悪性黒色腫等のMSHを発現している腫瘍の治療薬、特に悪性黒色腫の治療薬として用いることができる。

本発明のウイルスベクターを含有する医薬は、治療薬として該ベクター単独で投与することも可能ではあるが、通常は該ベクターを薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

【0026】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、通常は非経口経路、例えば皮下、筋肉内、静脈内、気道内等の投与経路が用いられる。

本発明のベクターを含有する治療薬は、治療薬として該ベクター単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0027】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミ

ント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0028】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該ベクターそのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該ベクターを微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該ベクターおよび用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

【0029】

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重、ウイルスベクターの種類等により異なるが、通常成人1回当たりウイルスベクターとして $10^3 \sim 10^{15}$ 個である。

本発明のウイルスベクターは、診断薬、例えば、悪性黒色腫等のMSHを発現している腫瘍の診断薬、特に悪性黒色腫の診断薬として用いることができる。例えば、本発明のウイルスベクターに標識となる遺伝子を組み込むことにより、悪性黒色腫等のMSHを発現している腫瘍を特異的に検出することができる。

【0030】

以下、ウイルスベクターとしてヒト5型のアデノウイルス (Ad5) を、MSHを結合させるウイルスを構成するタンパク質としてAd5のファイバーを用いて、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0031】

【実施例】

実施例1 MSH融合ファイバー変異型 (F/MSH) の変異を持つヒト5型アデノウイルス (以下、Ad5-F/MSHと略記する) の作成

a) F/MSH変異をコードするプラスミドの作成:

野生型のファイバーをコードする遺伝子領域の3'末端に11アミノ酸よりなるリンカーと13アミノ酸よりなるヒト α -MSHをコードする塩基配列 (配列番号1) を、合成オリゴヌクレオチドNo. 924 (126mer、配列番号2) をテンプレートとし、No. 933 (配列番号3) とNo. 934 (配列番号4) をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応法 (polymerase chain reaction、PCR) によって合成した。

【0032】

このPCR産物をEcoRIで切って、pBluescript SKII+ (ストラタジーン社) のEcoRIサイトへクローニングしてpSKII+nbMSHを得た (Yoshida et al., 1998)。さらに、pSKII+nbH (Yoshida et al., 1998) のHindIII/XhoI断片とpSKII+nbMSHのXhoI/MunI断片を、pSKII+[X-K] (Yoshida et al., 1998) のHindIII/MunIサイトへクローニングしてプラスミドpSKII+[X-K]nbMSHを得た。さらにpSKII+[X-K]nbMSHのNheI/KpnI断片 (2.1kbp) をpSKII+6.7Rnp (Yoshida et al., 1998) のNheI/KpnIサイトへサブクローニングして、pSKII+6.7R-MSHを得た。pSKII+6.7R-MSHからEcoRI/PacI断片を切り出してpTR (Yoshida et al., 1998) のEcoRI/PacIサイトへクローニングしてpTR-MSHを得た。F/MSH変異型のファイバーのC末端の予想アミノ酸配列は以下のようになる。ただし、数字は5型アデノウイルス (Ad5) のファイバーのN末端を1として数えたアミノ酸残基の位置を示す。

S₅₇₁SYTFSYIAQE₅₈₁PSASASASAPG₅₉₂SYSM

EHFRWGKPV₆₀₅

581までが本来のAd5ファイバーのアミノ酸配列、582から592までの11残基がリンカーのアミノ酸配列、593から605までの13残基がヒト α -MSHのアミノ酸配列である。

pTR-MSHを含む大腸菌であるEscherichia coli DH5 α /pTR-MSHは、平成11年2月22日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所にFERMBP-6656として寄託されている。

【0033】

b) F/MSH変異型組み換えアデノウイルスの作成

F/MSHを有する組み換えアデノウイルスは、公知の方法(Yoshida et al., 1998)に準じて作成した。すなわち、アデノウイルスAd5dlX[Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 1320-1324 (1996)]からゲノムDNA-末端タンパク質複合体(以下、DNA-TPCと略記する)を分離し、これをEcoRIとAseIで切断したものと、pTR-MSHのプラスミドDNAをPacIで切断したものとを、293細胞へ共トランスフェクションした。Yoshida et al., 1998にF/K20変異体の作成法として記載した方法と本質的に同じ方法を用いた。ただし従来通りの方法[Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 1320-1324 (1996)]に従って共トランスフェクションを行ったところ、繰り返し実験を行ったにもかかわらず、プラークは1つも得られなかった(Yoshida et al., 1998)。本実施例では、得られたAdv-F/MSH変異体のウイルスタイターがきわめて低いために、従来通りのウイルスプラーク作成法を用いてはウイルスの分離は困難と考えた。そこで本発明者は、DNAをトランスフェクトされた293細胞の96ウェルプレートへのまき込み数を従来法の30%とし、培養液のウシ胎児血清(Fetal bovine serum, FBS)の濃度を従来の10%からその半分の5%へと低くし、培養液をトランスフェクションから4日目、8日目、15日目の3回それぞれ1ウェルに50 μ lずつ適宜追加しながら3週間にわたって培養を続けたところ、よう

やく全体で2クローンのプラークを分離することができた。これらのウイルスを293細胞ならびにA375ヒト悪性黒色腫細胞に感染させて増幅させてから生物活性の検討を行った。得られたAd5-F/MSHのウイルス液のタイターは通常の293を用いたプラークアッセイ法では検出限界以下であった(10^5 p.f.u./ml以下)。

【0034】

c) F/MSHファイバー変異型アデノウイルスの293細胞ならびにA375ヒト悪性黒色腫細胞に対する感染によって起こる細胞毒性の検討

293細胞またはA375細胞を6ウェルプレートにまき、翌日コントロールの擬似感染(mock infection)、野生型(wt)アデノウイルスAd5dlX-F/wtの感染、ならびに、F/MSH変異型アデノウイルス(Ad5-F/MSH)の感染を行い、96時間後の細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。図1のAにコントロールの293細胞、B、CにそれぞれF/wtとF/MSHのAd5dlXアデノウイルスに感染した293細胞を示す。4日間の培養でBのF/wtの感染した293細胞はほとんど100%の細胞が死んで丸く浮き上がってくる。一方、CのF/MSHの感染した293細胞では細胞のダメージはほとんど見られずコントロール(A)とほぼ同等の形態を示した。

【0035】

図2のDにコントロールのA375細胞、E、Fが野生型ファイバー(F/wt)のAd5dlXアデノウイルスをそれぞれMOI 110、30で感染させたA375の形態を示す。4日間の培養で、293細胞の結果とは対照的に、F/wtの感染したA375細胞では、十分な細胞毒性は得られていない(図2のE、F)。一方、図3のGはF/MSH変異型ファイバーを有するAd5dlXアデノウイルス(Ad5-F/MSH)を感染させたA375細胞の形態を示す。4日間の培養で非常に強い細胞毒性が得られることがわかる。

以上の結果から、F/MSHファイバー変異型アデノウイルスは、293細胞に比し、A375ヒト悪性黒色腫細胞に対して効率高く、しかも選択性も優れた遺伝子導入の可能なベクターとして有用であることが示された。

【0036】

実施例2 MSH融合型の変異ファイバーを持つヒト5型アデノウイルスの改良型 (Ad5-F/asMSHa) の作成

実施例1の方法では、F/MSH変異型アデノウイルスの悪性黒色腫細胞に対する顕著な効果、すなわち、高効率の遺伝子導入と強い細胞毒性効果は示されたものの、得られたウイルス液のタイターが低い (10^5 pfu/ml以下) のでこれを改善する必要がある。そこで、以下に述べるようなファイバー変異型アデノウイルス作成方法を用いることによって、 10^7 から 10^8 pfu/ml 以上の実用上十分に高いタイターを有するMSH融合ファイバー変異アデノウイルスを得ることができた。

【0037】

a) F/asMSHaファイバー変異をコードするDNA断片の作成

α -MSHのコード領域とファイバーのポリAシグナル領域は、新しく合成したオリゴヌクレオチドプライマーのNo. 1061 (配列番号5) とNo. 1092 (配列番号6) を用いて、実施例1のpSKII+6.7R-MSHをテンプレートとしてPCR法によって合成した。

PCR産物をBamHI/EcoRIで切断して、pNEB193 (NEB社) のBamHI/EcoRIサイトへクローニングし、塩基配列を確認した。

【0038】

b) コスミドpWE6.7R-F/asMSHaの作成

コスミドpWE15 (GenBank accession, M99569) はClontech社 (Palo Alto, CA, USA) から購入した。pSKII+6.7R-K20 [Yoshida et al., Hum. Gene Ther. 9: 2503-2515 (1998) の2506ページに記載されている] のSacIIサイトをT4DNAポリメラーゼで平滑化して、ここに新たに合成したリン酸化BstBIリンカー (pdGCTTCGAAGC) を挿入した。これからAd5アデノウイルスのゲノムを含むEcoRI/BstBI断片を切り出し、pWE15のEcoRI/ClaIサイトにクローニングしてpWE6.7R-F/K20を得た。これからK20変異をコードする配列を含むBamHI/KpnI断片をa) で述べたNo. 1061-No. 1092P

CR産物のBamHI/KpnI断片に入れかえることによってpWE6.7R-F/asMSHaを得た。このときファイバーをコードする領域の塩基配列(Ad5-F/asMSHa. seq)およびコードするアミノ酸配列を配列番号7に示した。

【0039】

c) コスミドpWEAxKM-F/asMSHaの作成

ファルマシア社から購入したプラスミドpUC-4Kからカナマイシン耐性遺伝子を含むBamHI切断断片(1264bp)を切り出し、T4DNAポリメラーゼで末端を平滑化して、pAx-cw[Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1320-1324 (1996)]のSwaIサイトにクローニングしてpAxKMを得た。これのAd5のゲノムを含むEcoRI断片(約25773bp)を、b)で述べたpWE6.7R-F/asMSHaのEcoRIサイトにクローニングして、Ad5のゲノムが正しい方向につながっているものを選択することにより、全長約40702bpのコスミドpWEAxKM-F/asMSHaを得た。

【0040】

d) F/asMSHa変異型組み換えアデノウイルスの作成

アデノウイルスAd5dlXのDNA-TPCをEcoRIとAseIで切断したものと、pWEAxKM-F/asMSHaをClaIとPacIで切断したものとを、293細胞へ共トランスフェクションした。実施例1で述べたような細胞培養での工夫をする必要なく、従来通りの培養方法で、多数のプラークを分離することができ、ウイルスゲノムの解析結果からも、予想通りのF/asMSHa変異をもったAd5dlXの変異株であることが確認された。実施例1で述べたウイルスと区別するためこれをAd5-F/asMSHaと名付けた。Ad5-F/asMSHaウイルスのストック液のタイターは 1.10×10^8 pfu/mlと、実用上十分に高いタイターが得られた。

【0041】

実施例3 レポーターlacZ遺伝子を発現するF/asMSHaファイバー変異型組み換えアデノウイルスAxCAZ3-F/asMSHaの作成

E1A領域に各種外来性遺伝子の発現カセットを組み込んだF/a s M S H a ファイバー変異型アデノウイルス作成が可能なことを示すため、まずレポーターとして大腸菌lacZ遺伝子を発現する組み換え体の作成を試みた。

【0042】

Yoshida et al., 1998に記載されたpCAZ2からlacZを含むAseI断片(末端平滑化)約4889bpを、プロメガ社(Madison, WI, USA)から購入したpCIプラスミドのBglII/SalI(末端平滑化)サイトへクローニングしてpCAZ3を得た。これからBglII/BamHI断片(末端平滑化)約5153bpを切り出し、コスミドpAxcw(Miyake et al., 1996)のSwaIサイトにクローニングしてpAxCZ3を得た。このコスミドDNAと、Ad5dlXのDNA-TPCを用いて野生型ファイバー(F/wt)の組み換えアデノウイルスAxCZ3-F/wtを得た。これからさらにDNA-TPCを調製し、これをEcoRIとAseIで切断したものと、実施例2で得られたWEA x KM-F/a s M S H a コスミドDNAをClaIとPacIで切断したものとを、293細胞へ共トランスフェクションした。従来通りの培養法で多数のプラークを分離することができ、ウイルスゲノムの解析結果からも、予想通りのF/a s M S H a 変異をもち、なおかつ、E1A領域にレポーターlacZ発現カセットをもつ組換えアデノウイルスであることが確認された。この組換えウイルスをAxCZ3-F/a s M S H a と名付けた。

【0043】

実施例4 MSH受容体(以下、MSHRと略記する)を高発現する宿主細胞

を用いた、F/a s M S H a 変異型アデノウイルスの作成

a) MS HR を発現するレトロウイルスベクターの作成

ヒトのメラノーマ細胞A375の粗RNAから得たcDNAをテンプレートとし、MSHRをコードする領域のN末側半分をプライマーNo. 1037(配列番号8)とNo. 1040(配列番号11)、C末側半分をプライマーNo. 1038(配列番号9)とNo. 1039(配列番号10)を用いて増幅(RT-PCR法)し、MSHRのcDNA断片を得た。それぞれのDNA断片をEco

RI/KpnIで切断して、pBluescript IISK+のEcoRI/KpnIサイトにクローニングしたのち塩基配列を確認した。これから、N末側をEcoRI/KpnI、C末側をKpnI/NotIでそれぞれ切り出して、レトロウイルス作成用のプラスミドのpRx-bsr [Shinoura et al., Human Gene Ther. 9:1983-1993 (1998)] のEcoRI/NotIサイトへ3パート・ライゲーションでクローニングしてプラスミドpRxhMSHRを得た。このプラスミドを用いて文献(濱田洋文ら、レトロウイルスベクター 日本遺伝子治療学会編集: 遺伝子治療開発研究ハンドブック 第3章 導入技術、印刷中、エヌ・ティー・エス、1999)に記載の方法を用いてMSH発現レトロウイルス産生細胞の ϕ CRIP/MSHRを樹立した。

【0044】

b) MSHRを高発現する293宿主細胞由来の細胞株の作成

ϕ CRIP/MSHRの培養上清中のレトロウイルスを293細胞に感染させることによりMSHRを高発現する293/MSHR細胞株を得た。

c) 293/MSHRを用いたF/asMSHa変異型アデノウイルスの増幅

通常のアデノウイルス作成の宿主として用いる293細胞の代わりに、293/MSHR細胞を用いてF/asMSHa変異型アデノウイルスのタイターをブランクアッセイ法で測定すると、同一の液をアッセイしているにもかかわらず、293細胞で得られるタイター値に比べて3から10倍高い見かけ上のタイター値が得られた。これは、293細胞を使った場合に比べて293/MSHR細胞を使えばF/asMSHa変異型アデノウイルスの感染効率ならびにブランク形成率が高まるためと考えられる。つまり、293/MSHR細胞を宿主として用いれば、293細胞を使う場合よりもさらに高いタイターのウイルス液を調製できると考えられる。

【0045】

実施例5 β -MSH融合ファイバー変異型の組換えアデノウイルスの作成

実施例1から4までは、ヒト α -MSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成例を示した。さらに、 α -MSH以外のリガンドに関しても悪性黒色腫細

胞の治療に有用なファイバー変異型ウイルスを作成することが可能かどうかを、 β -MSHをリガンドの一例として用いて検討した。

a) β -MSH融合ファイバータンパク質をコードするプラスミドDNAの作成
 β -MSHをコードするPCR用のプライマーNo. 1075を新しく作成した(配列番号12)

No. 1075とNo. 1092(実施例2に記載)をプライマーとして、pSKI I+6.7RnpをテンプレートとしてPCRを行い、得られたPCR産物をBamHIとEcoRIで切断して、pNEB193のBamHI/EcoRIサイトにクローニングした後、塩基配列を確認した。 β -MSHをコードするDNA断片をBamHI/KpnIで切り出し、実施例2で得られたpWE6.7R-F/asMSHaのBamHI/KpnIサイトにクローニングしてpWE6.7R-F/asMSHbを得た。さらにこのEcoRIサイトに、pA_xKMのEcoRI断片(約25kbp)を順方向にクローニングして、pWEA_xKM-F/asMSHbコスミドDNAを得た。

【0046】

b) β -MSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

実施例2と同様の方法で、Ad5dlXのDNA-TPCとpWEA_xKM-F/asMSHbのDNAを293細胞に共トランスフェクトすることにより、 β -MSH融合ファイバー変異型アデノウイルスAd5-F/asMSHbを作成した。多くのプラークが得られ、ウイルスゲノムの解析からも、目的としたF/asMSHb変異ウイルスが得られたことが確認された。

【0047】

さらに実施例3と同様の方法で、A_xCAZ3-F/wtのDNA-TPCとpWEA_xKM-F/asMSHbのDNAを293細胞に共トランスフェクトすることにより、大腸菌lacZレポーター遺伝子発現カセットを持ち、なおかつ、 β -MSH融合ファイバー変異型の組換えアデノウイルスA_xCAZ3-F/asMSHbを作成した。F/asMSHb変異型のファイバーのDNA配列を配列番号13に示した。

【0048】

実施例6 GSリンカーを持つMSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

実施例1から5までは、アデノウイルスのファイバータンパク質のC末端にASリンカー (PSASASASAPG 配列番号25) をはさんで α -MSHないし β -MSHのリガンドのアミノ酸配列が続く構造 (β -MSHのリガンドの場合のASリンカーは、C末端にさらにセリン残基が付加されている) をもつ変異型アデノウイルスの作成例を示した。さらにASリンカー以外のリンカーに関しても、悪性黒色腫細胞の治療に有用なファイバー変異型ウイルスを作成することが可能かどうかを、GSリンカー (GSGSGSGSGSGSG 配列番号27; β -MSHのリガンドの場合は、C末端にさらにセリン残基が付加されている) を一つの例として用いて検討した。

a) GSリンカーをコードするプラスミドDNAの作成

GSリンカーをコードするプライマーNo. 1060 (61mer 配列番号14) を新たに合成した。さらにPCR反応を容易にするために、No. 1060よりも短くコドンの使用も少し異なるプライマーNo. 1098 (41mer 配列番号15) を新たに合成した。pSKII+6.7R-K20をテンプレートとしてさらにNo. 931 (Yoshida et al., 1998に記載 配列番号16) とNo. 1060でPCR反応を行い、そのPCR産物をテンプレートとしてさらにNo. 931とNo. 1098でPCR反応を行った。

【0049】

このPCR産物をHindIII/BamHIで切断してpNEB193にクローニングして、塩基配列を確認した。次にpWE6.7R-F/asMSHaとpWE6.7R-F/asMSHbのASリンカーを含むXhoI/BamHIのDNA断片を、GSリンカーを含むXhoI/BamHI DNA断片にそれぞれ入れ替えることにより、pWE6.7R-F/gsMSHaとpWE6.7R-F/gsMSHbを得た。それぞれのコスミドDNAのEcoRIサイトにpAxKMからのEcoRI断片 (約25kbp) を順方向でクローニングすることにより、それぞれpWEAxKM-F/gsMSHaとpWEAxKM-F/gsMSHbを得た。

【0050】

b) GSリンカーを有するMSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成
a) で作成したコスミドを、Ad5dlXないしAxCAZ3-F/wt由来のDNA-TPCと共にトランスフェクトすることにより、GSリンカーを有するMSH融合ファイバー変異型アデノウイルス4種を樹立できた。すなわち、Ad5-F/g sMSHa, Ad5-F/g sMSHb, AxCAZ3-F/g sMSHa, ならびにAxCAZ3-F/g sMSHbである。以上の4種は、ウイルスゲノムの解析結果からも、目的とする変異型アデノウイルスであることが確認された。

F/g sMSHaとF/g sMSHbのファイバーをコードする塩基配列およびそれがコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号17、18に示した。

【0051】

実施例7 K21リンカーを持つMSH融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

実施例1から6までは、ASリンカーないしGSリンカーのような11~12アミノ酸程度の比較的短いリンカー配列を有する変異型アデノウイルスの作成例を示したが、さらに多数のアミノ酸配列を有するリンカーに関しても悪性黒色腫細胞の治療に有用なファイバー変異型ウイルスを作成することが可能かどうかを、ASリンカー(11アミノ酸)またはGSリンカー(11アミノ酸)に25残基のアミノ酸配列(計37アミノ酸)を加えたリンカーであるasK21リンカー(配列番号29)とgsK21リンカー(配列番号31)を例として用いて検討した。

a) asK21リンカーならびにgsK21リンカーをコードするプラスミドDNAの作成

K21リンカーをコードするプライマーNo. 1089(128mer 配列番号19)を新たに合成した。No. 1089とNo. 1092のプライマーを用いてpSKII+6.7RnpをテンプレートにしてPCR反応を行い、PCR産物をEcoRIサイトにクローニングし、塩基配列を確認した。これのK21リンカーをコードする領域であるBglIIからBamHIまでのDNA断片

を pWE6. 7R-F/a sMSH a, pWE6. 7R-F/g sMSH a, pWE6. 7R-F/a sMSH b, pWE6. 7R-F/g sMSH b の BamHI サイトへ挿入することによって、それぞれ pWE6. 7R-F/a sK21MSH a, pWE6. 7R-F/g sK21MSH a, pWE6. 7R-F/a sK21MSH b, pWE6. 7R-F/g sMSH b のコスミド DNA を得た。これらの K21 リンカーを含むファイバーをコードするコスミドの EcoRI サイトに、pAxKM の EcoRI 断片 (約 25 kbp) を順方向でクローニングすることにより、それぞれ pWEAxKM-F/a sK21MSH a, pWEAxKM-F/g sK21MSH a, pWEAxKM-F/a sK21MSH b, pWEAxKM-F/g sK21MSH b のコスミド DNA を得た。

【0052】

b) a sK21 リンカーならびに g sK21 リンカーを有する MSH 融合ファイバー変異型アデノウイルスの作成

a) で作成したコスミド DNA を、Ad5dlX の DNA-TPC と共トランスフェクトすることにより、それぞれ Ad5-F/a sK21MSH a, Ad5-F/g sK21MSH a, Ad5-F/a sK21MSH b, Ad5-F/g sK21MSH b のアデノウイルスを樹立することができた。Ad5-F/a sK21MSH a, Ad5-F/g sK21MSH a, Ad5-F/a sK21MSH b, Ad5-F/g sK21MSH b のファイバーをコードする領域の DNA 配列およびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 20、21、22、23 に示した。また同様に、AxCAZ3-F/wt の DNA-TPC と共トランスフェクトすることにより、それぞれ、AxCAZ3-F/a sK21MSH a, AxCAZ3-F/g sK21MSH a, AxCAZ3-F/a sK21MSH b, AxCAZ3-F/g sK21MSH b のアデノウイルスを樹立することができた。以上の 8 種は、ウイルスゲノムの解析結果からも、目的とするファイバー変異型アデノウイルスであることが確認された。

【0053】

【発明の効果】

本発明によれば、ウイルスを構成しているタンパク質に MSH 受容体に特異的

に結合するリガンドを結合させてなるウイルスベクター、および該ベクターを用いた悪性黒色腫等のMSH受容体を発現している腫瘍に対する診断薬および治療薬を提供することができる。

【0054】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1：5型アデノウイルスのファイバーの一部、ASリンカーペプチドおよび α -MSHをコードするDNA

配列番号2：配列番号1のDNAをPCRで増幅させるためのテンプレートとして使用する合成DNA No. 924

配列番号3：配列番号1のDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 933

配列番号4：配列番号1のDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 934

配列番号5： α -MSHおよびアデノウイルスのファイバーのポリAシグナルをコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1061

配列番号6： α -MSHおよびアデノウイルスのファイバーのポリAシグナルをコードするDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1092

配列番号7：pWE6.7R-F/asMSHaの変異型ファイバータンパク質をコードするDNA

配列番号8：ヒトMSH受容体の1-154残基をコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1037

配列番号9：ヒトMSH受容体の150-317残基をコードするDNAをPCRで増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1038

配列番号10：ヒトMSH受容体の150-317残基をコードするDNAをPCRで増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成DNA No. 1039

配列番号 11 : ヒト MSH 受容体の 1-154 残基をコードする DNA を PCR で増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成 DNA No. 1040

配列番号 12 : β -MSH および アデノウイルスのファイバーのポリ A シグナルをコードする DNA を PCR で増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成 DNA No. 1075

配列番号 13 : pWE6. 7R-F / a s MSHb の変異型ファイバータンパク質をコードする DNA

配列番号 14 : 5 型 アデノウイルスのファイバーの一部および GS リンカーペプチドをコードする DNA を PCR で増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成 DNA No. 1060

配列番号 15 : 5 型 アデノウイルスのファイバーの一部および GS リンカーペプチドをコードする DNA を PCR で増幅させるためのアンチセンスプライマーとして使用する合成 DNA No. 1098

配列番号 16 : 5 型 アデノウイルスのファイバーの一部および GS リンカーペプチドをコードする DNA を PCR で増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成 DNA No. 931

配列番号 17 : pWE6. 7R-F / g s MSHa の変異型ファイバータンパク質をコードする DNA

配列番号 18 : pWE6. 7R-F / g s MSHb の変異型ファイバータンパク質をコードする DNA

配列番号 19 : K21 リンカーをコードする DNA を PCR で増幅させるためのセンスプライマーとして使用する合成 DNA No. 1089

配列番号 20 : pWE6. 7R-F / a s K21 MSHa の変異型ファイバータンパク質をコードする DNA

配列番号 21 : pWE6. 7R-F / g s K21 MSHa の変異型ファイバータンパク質をコードする DNA

配列番号 22 : pWE6. 7R-F / a s K21 MSHb の変異型ファイバータンパク質をコードする DNA

配列番号 23 : pWE6. 7R-F / g s K 2 1 M S H b の変異型ファイバータンパク質をコードする DNA

配列番号 24 : A S リンカーをコードする DNA

配列番号 25 : A S リンカーペプチド

配列番号 26 : G S リンカーをコードする DNA

配列番号 27 : G S リンカーペプチド

配列番号 28 : a s K 2 1 リンカーをコードする DNA

配列番号 29 : a s K 2 1 リンカーペプチド

配列番号 30 : g s K 2 1 リンカーをコードする DNA

配列番号 31 : g s K 2 1 リンカーペプチド

配列番号 32 : pWE6. 7R-F / a s M S H a にコードされる変異型ファイバータンパク質

配列番号 33 : pWE6. 7R-F / a s M S H b にコードされる変異型ファイバータンパク質

配列番号 34 : pWE6. 7R-F / g s M S H a にコードされる変異型ファイバータンパク質

配列番号 35 : pWE6. 7R-F / g s M S H b にコードされる変異型ファイバータンパク質

配列番号 36 : pWE6. 7R-F / a s K 2 1 M S H a にコードされる変異型ファイバータンパク質

配列番号 37 : pWE6. 7R-F / g s K 2 1 M S H a にコードされる変異型ファイバータンパク質

配列番号 38 : pWE6. 7R-F / a s K 2 1 M S H b にコードされる変異型ファイバータンパク質

配列番号 39 : pWE6. 7R-F / g s K 2 1 M S H b にコードされる変異型ファイバータンパク質

【0055】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Juridical Foundation, Japanese Foundation For Cancer Research

<120> vector for gene therapy of malignant melanoma, with use of virus having MSH fused protein.

<130> H11-0241J2

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber, AS linker peptide and α -MSH.

gaa Glu

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(113)

<400> 1

gg gaa ttc tcg agt tac act ttt tca tac att gcc caa gaa cca tca

47

Glu	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Phe	Ser	Tyr	Ile	Ala	Gln	Glu	Pro	Ser		
1					5				10				15			
gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga tcc tac tcc atg gag cac ttc														95		
Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	
			20						25				30			
cgc tgg ggc aag ccg gtg taaagaatcg tttgtgttat gtttcaacgt														143		
Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val											
			35													
gtttattttt caattgaatt ccc														166		

<210> 2

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.924 used as template for PCR amplification of DNA sequence No.1.

<400> 2

cggtgaaaca taacacaaac gattctttac accggcttgc cccagcggaa gtgctccatg	60
gagtaggatac cagggcgga agcagatgag gaggtgatg gttcttgggc aatgtatgaa	120
aaagtg	126

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.933 used as sense primer for PCR amplification of DNA sequence No.1.

<400> 3

gggaattctc gagttacact tttcataca ttgccaag

39

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.934 used as antisense primer for PCR amplification of DNA sequence No.1.

<400> 4

gggaattcaa ttgaaaaata aacacgttga aacataacac aaacgattc

49

<210> 5

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1061 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding α -MSH and adenovirus fiber poly A signal.

<400> 5

cgggatccta ctccatggag cacttcggt ggggcaagcc ggtgtaagtc gacaagaata 60
aagaatcggt tgtgtt 76

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1092 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding α -MSH and adenovirus fiber poly A signal.

<400> 6

cggaattcat ggcgcatgt ttaatcagag gt 32

<210> 7

<211> 1818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pNE6.7R-F/asMSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1815)

<400> 7

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt ggc ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210	215	220	
ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720			
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr			
225	230	235	240
gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768			
Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala			
245	250	255	
gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816			
Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val			
260	265	270	
agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864			
Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln			
275	280	285	
ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912			
Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn			
290	295	300	
aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960			
Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu			
305	310	315	320
gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008			
Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile			
325	330	335	

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

tcc tac tcc atg gag cac ttc cgc tgg ggc aag ccg gtg taa

1818

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

595

600

605

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1037 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding human MSH receptor residue 1-154.

<400> 8

gggaattcac catggctgtg cagggatccc agagaagact

40

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1038 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding human MSH receptor residue 150-317.

<400> 9

gggaattcac caggagcatg tcagcacctc ctt

33

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1039 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding human MSH receptor residue 150-317.

<400> 10

ctgcgtacc acagcatcgt gaccctg

27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1040 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding human MSH receptor residue 1-154.

<400> 11

gctgtgtac cgcagtgcgt agaagat

27

<210> 12

<211> 107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1075 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding β -MSH and adenovirus fiber poly A signal.

<400> 12

cgcggtatccg ccgagaagaa ggacgagggc ccctacagga tggagcactt ccgtggggc 60

agcccgccca aggactaagt cgacaagaat aaagaatcgt ttgtgtt 107

<210> 13

<211> 1848

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/asMSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<400> 13

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100	105	110	
act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384			
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr			
115	120	125	
atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432			
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile			
130	135	140	
gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480			
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln			
145	150	155	160
aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528			
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr			
165	170	175	
gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576			
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu			
180	185	190	
aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624			
Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly			
195	200	205	
gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672			
Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr			
210	215	220	

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720
 Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
 225 230 235 240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768
 Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
 245 250 255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816
 Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
 260 265 270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864
 Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
 275 280 285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912
 Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
 290 295 300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960
 Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
 305 310 315 320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008
 Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
 325 330 335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056
Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
340 345 350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp
355 360 365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152
Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
370 375 380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
385 390 395 400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248
Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
405 410 415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
420 425 430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
435 440 445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct gcc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

tcc gcc gag aag aag gac gag ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc 1824

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

595

600

605

tgg ggc agc ccg ccc aag gac taa

1848

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

610

615

<210> 14

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1060 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber and GS linker peptide

<400> 14

cgggatccag atccagaacc actaccactt ccagaacctt cttgggcaat gtatgaaaa 60

g

61

<210> 15

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1098 used as antisense primer for PCR amplification of DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber and GS linker peptide

<400> 15

cgtgtggatc cgctgccaga accactacca cttccagaac c

41

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.931 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding a part of adenovirus type 5 fiber and GS linker peptide.

<400> 16

ggcctttact tgtttacagc

20

<210> 17

<211> 1818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/gsMSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1815)

<400> 17

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg etc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305 310 315 320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

tcc tac tcc atg gag cac ttc cgc tgg ggc aag ccg gtg taa 1818

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

595

600

605

<210> 18

<211> 1848

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/gsMSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<400> 18

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210	215	220	
ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720			
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr			
225	230	235	240
gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768			
Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala			
245	250	255	
gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816			
Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val			
260	265	270	
agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864			
Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln			
275	280	285	
ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912			
Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn			
290	295	300	
<hr/>			
aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960			
Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu			
305	310	315	320
gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008			
Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile			
325	330	335	

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392
 Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
 450 455 460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440
 Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
 465 470 475 480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488
 Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
 485 490 495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536
 Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
 500 505 510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584
 Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
 515 520 525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632
 Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
 530 535 540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680
 Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
 545 550 555 560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

tcc gcc gag aag aag gac gag ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc 1824

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

595

600

605

tgg ggc agc ccg ccc aag gac taa 1848

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

610

615

<210> 19

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic DNA No.1089 used as sense primer for PCR amplification of DNA coding K21 linker peptide.

<400> 19

ccggaattca gatctggatc taagaagaag aagaagaaaa agaagaaaaa gaagaagaag 60

aaaaaaaaaga agaagaaaaa gaaaggatcc taagatatcg tcgacaagaa taaagaatcg 120

tttgtgtt 128

<210> 20

<211> 1893

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/ask21MSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1890)

<400> 20

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg.Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50	55	60	
aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc	240		
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser			
65	70	75	80
caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac	288		
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn			
85	90	95	
ala aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta	336		
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu			
100	105	110	
act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc	384		
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr			
115	120	125	
atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att	432		
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile			
130	135	140	
gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa	480		
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln			
145	150	155	160
aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act	528		
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr			
165	170	175	

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912
Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290 295 300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960
Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305 310 315 320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008
Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056
Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152
Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
405 410 415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
420 425 430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
435 440 445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392
Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
450 455 460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440
Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
465 470 475 480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488
Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
485 490 495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536
Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
500 505 510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584
Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632
Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680
Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728
His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gca tct get tcc gcc cct gga 1776
Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824
Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc tac tcc atg gag cac ttc 1872
Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe

610

615

620

cgc tgg ggc aag ccg gtg taa 1893
Arg Trp Gly Lys Pro Val

625

630

<210> 21

<211> 1893

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/gsK21MSHa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1890)

<400> 21

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48
Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96
Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tet 144
Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50	55	60	
aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240			
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser			
65	70	75	80
caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288			
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn			
	85	90	95
ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336			
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu			
	100	105	110
act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384			
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr			
	115	120	125
atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432			
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile			
	130	135	140
gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480			
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln			
145	150	155	160
aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528			
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr			
	165	170	175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624
Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
195 200 205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672
Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
210 215 220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768
Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816
Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864
Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu	
405 410 415	
aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata	1296
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile	
420 425 430	
ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata	1344
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile	
435 440 445	
tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat	1392
Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn	
450 455 460	
gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt	1440
Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe	
465 470 475 480	
aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga	1488
Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly	
485 490 495	
ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc	1536
Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala	
500 505 510	
aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa	1584
Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys	

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tcl ggc agc gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc tac tcc atg gag cac ttc 1872

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe

610

615

620

cgc tgg ggc aag ccg gtg taa

1893

Arg Trp Gly Lys Pro Val

625

630

<210> 22

<211> 1923

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/ask21MSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1920)

<400> 22

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48
Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ctt act cct ccc 96
Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

~~ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144~~
Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg etc 192
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50	55	60	
aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240			
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser			
65	70	75	80
caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288			
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn			
	85	90	95
ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336			
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu			
100	105	110	
act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384			
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr			
115	120	125	
atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432			
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile			
130	135	140	
gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480			
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln			
145	150	155	160
aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528			
Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr			
165	170	175	

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ctt tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca lac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580

585

590

tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc gcc gag aag aag gac gag 1872

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610

615

620

ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc tgg ggc agc ccg ccc aag gac 1920

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

625

630

635

640

taa

1923

<210> 23

<211> 1923

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding a modified fiber protein of pWE6.7R-F/gsK21MSHb

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1920)

<400> 23

atg aag cgc gca aga ccg tct gaa gat acc ttc aac ccc gtg tat cca 48

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

~~tat gac acg gaa acc ggt cct cca act gtg cct ttt ett act cct ccc 96~~

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

ttt gta tcc ccc aat ggg ttt caa gag agt ccc cct ggg gta ctc tct 144

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

ttg cgc cta tcc gaa cct cta gtt acc tcc aat ggc atg ctt gcg ctc 192
Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

aaa atg ggc aac ggc ctc tct ctg gac gag gcc ggc aac ctt acc tcc 240
Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

caa aat gta acc act gtg agc cca cct ctc aaa aaa acc aag tca aac 288
Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

ata aac ctg gaa ata tct gca ccc ctc aca gtt acc tca gaa gcc cta 336
Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

act gtg gct gcc gcc gca cct cta atg gtc gcg ggc aac aca ctc acc 384
Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

atg caa tca cag gcc ccg cta acc gtg cac gac tcc aaa ctt agc att 432
Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

gcc acc caa gga ccc ctc aca gtg tca gaa gga aag cta gcc ctg caa 480
Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

aca tca ggc ccc ctc acc acc acc gat agc agt acc ctt act atc act 528

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175

gcc tca ccc cct cta act act gcc act ggt agc ttg ggc att gac ttg 576
Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

aaa gag ccc att tat aca caa aat gga aaa cta gga cta aag tac ggg 624
Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
195 200 205

gct cct ttg cat gta aca gac gac cta aac act ttg acc gta gca act 672
Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
210 215 220

ggt cca ggt gtg act att aat aat act tcc ttg caa act aaa gtt act 720
Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

gga gcc ttg ggt ttt gat tca caa ggc aat atg caa ctt aat gta gca 768
Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

gga gga cta agg att gat tct caa aac aga cgc ctt ata ctt gat gtt 816
Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

agt tat ccg ttt gat gct caa aac caa cta aat cta aga cta gga cag 864
Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

ggc cct ctt ttt ata aac tca gcc cac aac ttg gat att aac tac aac 912
Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

aaa ggc ett tac ttg ttt aca gct tca aac aat tcc aaa aag ctt gag 960
Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

gtt aac cta agc act gcc aag ggg ttg atg ttt gac gct aca gcc ata 1008
Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

gcc att aat gca gga gat ggg ctt gaa ttt ggt tca cct aat gca cca 1056
Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

aac aca aat ccc ctc aaa aca aaa att ggc cat ggc cta gaa ttt gat 1104
Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

tca aac aag gct atg gtt cct aaa cta gga act ggc ctt agt ttt gac 1152

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

agc aca ggt gcc att aca gta gga aac aaa aat aat gat aag cta act 1200
Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

ttg tgg acc aca cca gct cca tct cct aac tgt aga cta aat gca gag 1248
Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

aaa gat gct aaa ctc act ttg gtc tta aca aaa tgt ggc agt caa ata 1296
Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

ctt gct aca gtt tca gtt ttg gct gtt aaa ggc agt ttg gct cca ata 1344
Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

tct gga aca gtt caa agt gct cat ctt att ata aga ttt gac gaa aat 1392
Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

gga gtg cta cta aac aat tcc ttc ctg gac cca gaa tat tgg aac ttt 1440
Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

aga aat gga gat ctt act gaa ggc aca gcc tat aca aac gct gtt gga 1488
Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

ttt atg cct aac cta tca gct tat cca aaa tct cac ggt aaa act gcc 1536
Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

aaa agt aac att gtc agt caa gtt tac tta aac gga gac aaa act aaa 1584

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

cct gta aca cta acc att aca cta aac ggt aca cag gaa aca gga gac 1632

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

aca act cca agt gca tac tct atg tca ttt tca tgg gac tgg tct ggc 1680

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

cac aac tac att aat gaa ata ttt gcc acc tcg agt tac act ttt tca 1728

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

tac att gcc caa gaa ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga 1776

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

tct gga tct aag aag aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag 1824

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

aaa aaa aag aag aag aaa aag aaa gga tcc gcc gag aag aag gac gag 1872

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610

615

620

ggc ccc tac agg atg gag cac ttc cgc tgg ggc agc ccg ccc aag gac 1920

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp
 625 630 635 640

taa

1923

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding AS linker

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 24

cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga

33

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

1

5

10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AS linker peptide

<400> 25

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

1 5 10

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding GS linker

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 26

ggt tct gga agt ggt agt ggt lct ggc agc gga

33

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GS linker peptide

<400> 27

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

<210> 28

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding asK21 linker

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(108)

<400> 28

cca tca gcc tcc gca tct gct tcc gcc cct gga tct gga tct aag aag 48

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1

5

10

15

aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag aaa aaa aag aag aag 96

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20

25

30

aaa aag aaa gga

108

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 29

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ask21 linker peptide

<400> 29

Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1

5

10

15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20

25

30

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 30

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA coding gsK21 linker

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(108)

<400> 30

ggt tct gga agt ggt agt ggt tct ggc agc gga tct gga tct aag aag 48

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1

5

10

15

aag aag aag aaa aag aag aaa aag aag aag aag aaa aaa aag aag aag 96

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20

25

30

aaa aag aaa gga

108

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 31

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> gsK21 linker peptide

<400> 31

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys Lys

1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20 25 30

Lys Lys Lys Gly

35

<210> 32

<211> 605

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/asMSHa

<400> 32

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
195 200 205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
210 215 220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
290 295 300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
530 535 540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly
580 585 590

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
595 600 605

<210> 33

<211> 615

<212> PBT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/asMSHb

<400> 33

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
195 200 205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
210 215 220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
290 295 300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435 440 445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450 455 460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530 535 540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580 585 590

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

595 600 605

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

610 615

<210> 34

<211> 605

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/gsMSHa

<400> 34

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
290 295 300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val

595

600

605

<210> 35

<211> 615

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7B-F/gsMSHb

<400> 35

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

70

75

80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

~~Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu~~

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Glu

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Th

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
435 440 445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
450 455 460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
530 535 540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
580 585 590

Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg
595 600 605

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp
610 615

<210> 36

<211> 630

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/ask21MSHa

<400> 36

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435 440 445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450 455 460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
530 535 540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly
580 585 590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
595 600 605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe
610 615 620

Arg Trp Gly Lys Pro Val

625

630

<210> 37

<211> 630

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/gsk21MSHa

<400> 37

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1

5

10

15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20

25

30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35

40

45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50

55

60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65

70

75

80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala

245

250

255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val

260

265

270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln

275

280

285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn

290

295

300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu

305

310

315

320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515

520

525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
580 585 590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
595 600 605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Tyr Ser Met Glu His Phe
610 615 620

Arg Trp Gly Lys Pro Val
625 630

<210> 38

<211> 640

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/ask21MSHb

<400> 38

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro

1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro

20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu

50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser

65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
195 200 205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
210 215 220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
290 295 300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile

325

330

335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro

340

345

350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp

355

360

365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp

370

375

380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr

385

390

395

400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

~~Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile~~

435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys

515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530 535 540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545 550 555 560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565 570 575

Tyr Ile Ala Gln Glu Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly

580 585 590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595 600 605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610 615 620

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp
625 630 635 640

<210> 39

<211> 640

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a modified fiber protein encoded in pWE6.7R-F/gsk21MSHb

<400> 39

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn

85

90

95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu

100

105

110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr

115

120

125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile

130

135

140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln

145

150

155

160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr

165

170

175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu

180

185

190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

195

200

205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr

210

215

220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr

225

230

235

240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245 250 255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260 265 270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275 280 285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
290 295 300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu

405

410

415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile

420

425

430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile

435

440

445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn

450

455

460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe

465

470

475

480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly

485

490

495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala

500

505

510

~~Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys~~

~~515~~

~~520~~

~~525~~

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp

530

535

540

Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly

545

550

555

560

His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser

565

570

575

Tyr Ile Ala Gln Glu Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

580

585

590

Ser Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys

595

600

605

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly Ser Ala Glu Lys Lys Asp Glu

610

615

620

Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp

625

630

635

640

【図面の簡単な説明】

【図 1】 293細胞に対し、野生型アデノウイルスAd5dlX-F/wtおよびF/MSH変異型アデノウイルスAd5-F/MSHを感染させ4日間培養後の細胞形態を示す図である。Aはコントロールの擬似感染、Bは野生型アデノウイルスAd5dlX-F/wt、CはF/MSH変異型アデノウイルスAd5-F/MSHを感染させたものをそれぞれ示す。

【図 2】 A375細胞に対し、野生型アデノウイルスAd5dlX-F/wtを感染させ4日間培養後の細胞形態を示す図である。Dはコントロールの擬似感染、EとFは野生型アデノウイルスAd5dlX-F/wtをそれぞれMOI 10、30で感染させたものをそれぞれ示す。

【図 3】 A375細胞に対し、F/MSH変異型アデノウイルスAd5-F/MSHを感染させ4日間培養後の細胞形態を示す図である。

【書類名】

図面

【図 1】

図面代用写真

293
Ad5-F/MSH

C

293

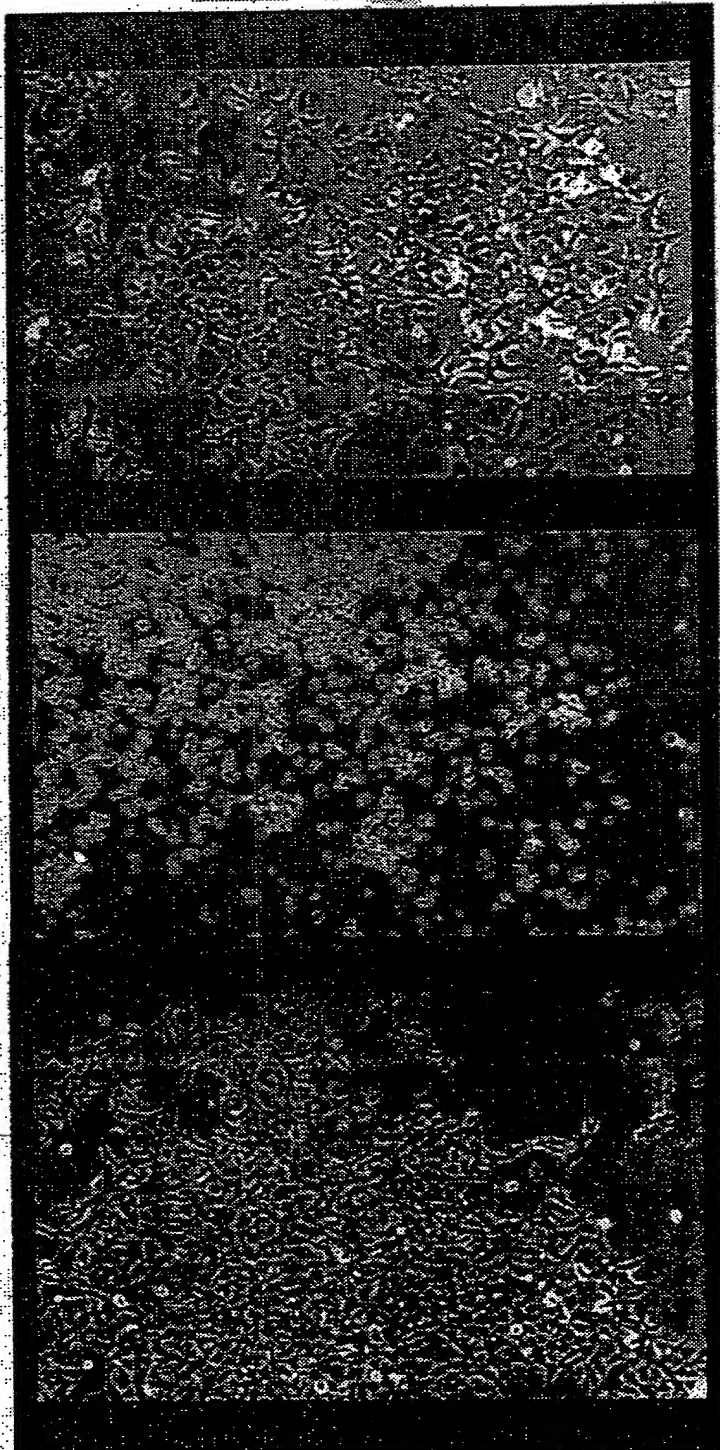
Ad5-F/wt (MOI 10)

B

293

mock

A



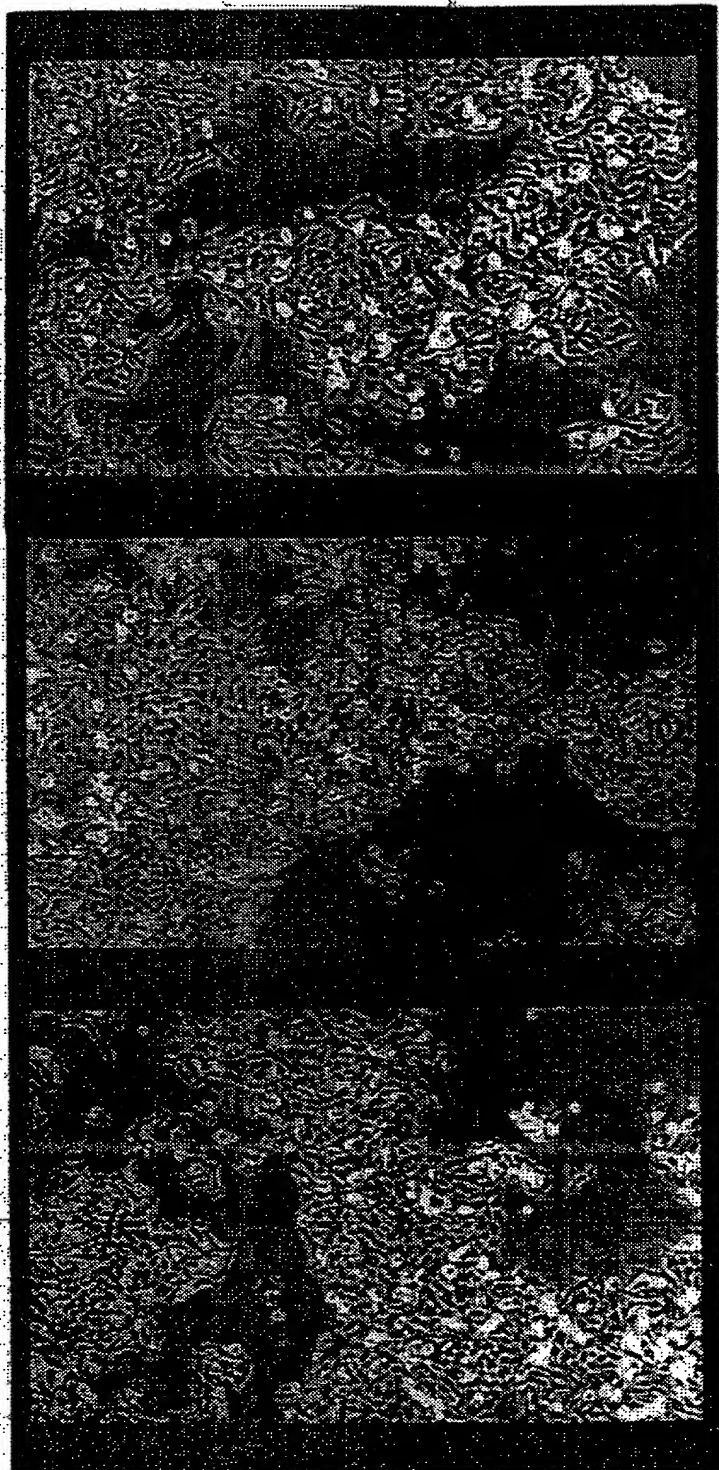
【図 2】

図面代用写真

D A375 mock

E A375 Ad5-F/wt (MOI 10)

F A375 Ad5-F/wt (MOI 30)

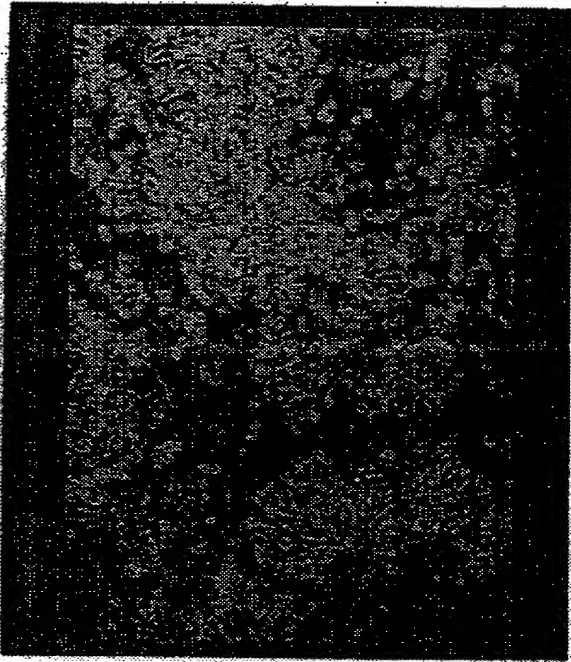


【図3】

図面代用写真

G

A375
Ad5-F/MSH



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

従来の治療に対して抵抗性で予後のきわめて悪い悪性黒色腫等の腫瘍の治療および診断に有用なウイルスベクターおよび当該ウイルスベクターを用いた腫瘍の診断法および治療法が求められている。

【解決手段】

本発明は、ウイルスを構成するタンパク質に、メラニン細胞刺激ホルモン (M S H) 受容体に特異的に結合するリガンドを結合させてなるウイルスベクターおよび、該ベクターを用いた腫瘍に対する診断薬および治療薬を提供する。

【選択図】 図3

29903800144



委任状

平成11年 2月 23日

私は、識別番号100106574 弁理士 岩 橋 和 幸 氏を以って
代理人として下記事項を委任します。

記

1. 特 許 出 願

に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定
不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 願 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並び
にその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並び
に本件に関する上記事項一切。

4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、
実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の
下附を受けること。

5. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護商標）登録に対する
登録異議の申立てに関する手続。

6. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する
答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 東京都豊島区上池袋一丁目37番1号

氏 名 財団法人 癌 研 究 会
理事長 渡邊 宏

国際様式 INTERNATIONAL FORM



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 財団法人 癌研究会
寄託者 理事長 渡邊 宏
あ て 名 氏 東京都豊島区上池袋一丁目37番1号

殿

29903800144



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli DH5α/pTR-MSH	(受託番号) FERM BP- 6656
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 2 月 22 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所	
<p>名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大塚 信一 Dr. Shinobu Otsuka Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p>	
平成 11 年 (1999) 2 月 22 日	

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第093263号
受付番号	29903800144
書類名	特許願
担当官	清水 スズ子 1350
作成日	平成11年 5月19日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	原寄託についての受託証	1
---------	-------------	---

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173588]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都豊島区上池袋1丁目37番1号
氏 名	財団法人癌研究会

